Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-W. ALTMANN

ZUR ZELLPROLIFERATION DER RATTENMILZ UNTER N-NITROSO-MORPHOLIN IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN

- Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin -

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Armin Meisterernst

aus Köritz

Würzburg, den 9. Juli 1981

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-W. ALTMANN

ZUR ZELLPROLIFERATION DER RATTENMILZ UNTER N-NITROSO-MORPHOLIN IN VERSCHIEDENEN KONZENTRATIONEN

- Autoradiographische Untersuchungen mit ^{3}H-Thymidin -

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Armin Meisterernst

aus Köritz

Würzburg, den 9. Juli 1981

Referent:	Prof. Dr. med. W.-D. HEINE
Korreferent:	Prof. Dr. med. H.-W. ALTMANN
Dekan:	Prof. Dr. med. K.-H. WULF

Tag der mündlichen Prüfung: 5.11.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Seite

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung..... 1

2. Material und Methode..... 3
2.1. Versuchstiere..... 3
2.2. Vorbehandlung..... 3
2.3. Versuchsanordnung..... 4
2.3.1. Vergiftung mit NNM..... 4
2.3.2. Singuläre Injektionstechnik..... 4
2.3.3. Tötungszeit und Tötungsart..... 5
2.4. Autoradiographische Technik..... 5
2.4.1. Herstellung der Autoradiogramme.... 5
2.4.2. Auswertung der Autoradiogramme..... 6
2.4.2.1. Zonale Einteilung der Milz 6
2.4.2.2. Markierungsindex..... 8
2.4.2.3. Mitosen- und Megakaryocytenindex..... 8

3. Ergebnisse..... 9
3.1. Zur Proliferation der roten Pulpa unter NNM..... 9
3.1.1. Markierungsindex..... 9
3.1.1.1. Kontrolltiere..... 10
3.1.1.2. 6 mg%ige NNM-Lösung..... 10
3.1.1.3. 12 mg%ige NNM-Lösung..... 10
3.1.1.4. 50 mg%ige NNM-Lösung..... 11
3.1.1.5. Zusammenfassung..... 11
3.1.2. Zur Zelldichte der roten Pulpa unter NNM..... 12
3.2. Zur Proliferation der weißen Pulpa unter NNM..... 14

Seite

3.2.1. Markierungsindex des Follikel-(Keim)-zentrums..... 14
3.2.1.1. Kontrolltiere..... 14
3.2.1.2. 6 mg%ige NNM-Lösung..... 15
3.2.1.3. 12 mg%ige NNM-Lösung..... 15
3.2.1.4. 50 mg%ige NNM-Lösung..... 15
3.2.2. Zur Zelldichte des Follikel-(Keim)-zentrums unter NNM..... 16
3.2.3. Markierungsindex der Follikelschale..... 17
3.2.4. Zur Zelldichte der Follikelschale unter NNM..... 18
3.3. Zur Proliferation der Follikelrandzone unter NNM..... 19
3.3.1. Markierungsindex..... 19
3.3.1.1. Kontrolltiere..... 20
3.3.1.2. 6 mg%ige NNM-Lösung..... 20
3.3.1.3. 12 mg%ige NNM-Lösung..... 20
3.3.1.4. 50 mg%ige NNM-Lösung..... 20
3.3.2. Zur Zelldichte der Follikelrandzone unter NNM..... 21
3.4. Zum Trinkverhalten der Versuchstiere unter NNM..... 22
3.5. Zum Gewicht der Versuchstiere unter NNM.. 23
4. Diskussion..... 25
4.1. Kontrollbereich..... 25
4.2. Veränderungen in der roten Pulpa unter NNM..... 28
4.3. Follikelrandzone..... 37
4.4. Veränderungen in der weißen Pulpa unter NNM..... 39

Seite

4.5. Zur Rhythmik der Zellproliferation unter NNM..... 44
4.6. Mögliche Wechselwirkung zwischen Tumorentstehung und Immunsystem..... 45

5. Zusammenfassung..... 48

Literaturverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543527_0009

1. Einleitung

Voraussetzung und Fragestellung

Die Milz zählt man seit BIZZOZERO (1893) zu den Organen mit labilen Elementen, deren extreme Proliferation (ALTMANN, 1966) durch entzündliche, immunologische und tumoröse Prozesse beeinflußt werden kann (GRAMLICH et al., 1970; STÖCKER et al., 1972; HELPAP et al., 1975). Zu einer Steigerung der Zellproliferation in fast allen Milzzonen führt z. B. eine traumatische Schädigung der Leber durch eine Catgutimplantation. (HELPAP et al., 1974)

In der vorliegenden Arbeit wird die Auswirkung des Carcinogen N-Nitroso-Morpholin auf die Zellproliferation der Milz bei ausgewachsenen Ratten untersucht.

Die organischen N-Nitrosoverbindungen gehören zur Gruppe der stärksten multipotenten Carcinogene, die in Organen und Organsystemen bösartige Tumoren erzeugen. Zahlreiche Tierexperimente an verschiedenen Tierspezies bewiesen die hohe carcinogene Wirkung und biologische Wirksamkeit der Nitrosoverbindungen, deren Zielorgan besonders die Leber ist. (MAGEE und BARNES, 1956; PREUSSMANN, 1974; SCHMÄL und HABS, 1980)

Die Feststellung von flüchtigen Mengen der N-Nitroso-Verbindungen in der menschlichen Umwelt (PREUSSMANN, 1974) zeigte das Risiko der Inkorporation für die Menschen schon an. Die Überzeugung verstärkt sich, daß die Nitrosoverbindungen in der Umwelt und jene, die im menschlichen Körper gebildet werden, eine mögliche Ursache für bösartige Organtumoren des Menschen sind. (SHIGEYOSHI ODASHIMA, 1980)

Das cyclische Nitrosamin N-Nitroso-Morpholin wurde von DRUCKREY und Mitarbeitern (1967) als besonders potentes Lebercarcinogen erkannt. Es ist bewiesen, daß N-Nitroso-Morpholin an Ratten Lebertumoren erzeugt. (DRUCKREY et al., 1967; BANNASCH und MÜLLER, H. A., 1964; BANNASCH, 1968, 1973) Die zellulären präneoplastischen Veränderungen der durch NNM-induzierten Hepatomen (BANNASCH und KLINGE, 1971) und das Auftreten von multiplen Glykogenspeicherherden sind morphologisch und cytochemisch gut beschrieben worden. Bei der Hepatombildung kommt es nach einer dosisabhängigen Latenzzeit zur Transformation der Glykogenspeicherzellen in glykogenarme Tumorzellen. (BANNASCH, 1979)

Auffallend bei der Hepatomentstehung ist, daß sie anscheinend ohne jede Reaktion des Immunsystems abläuft, aber eine besondere lokale Proliferation der Kupfferschen Sternzellen der Leber feststellbar ist. (HEINE, 1980)

Die Milz spielt im Rahmen des Reticulo-Endothelialen-Systems (RES) und des Immunsystems eine entscheidende Rolle.

Die enge Korrelation zwischen lymphatischem Gewebe und RES in der Milz wirft die Frage auf, in welcher möglichen Wirkungsweise das Carcinogen N-Nitroso-Morpholin (NNM) in diese beiden Zellsysteme eingreift.

Ziel dieser Arbeit ist es auch aufzuzeigen, ob die carcinogene Wirkung des NNM die komplexe Wechselwirkung zwischen Makrophagen, T- und B-Lymphocyten stören und ob eventuell eine maligne Transformation der Lymphocyten induziert werden kann.

2. Material und Methode[+)]

2.1. Versuchstiere

Den Untersuchungen lagen insgesamt 108 männliche Sprague-Dawley Ratten zugrunde, von denen 16 als Kontrollen dienten.

Ihre Nahrung bestand aus Altromin[R] ad libitum und Leitungswasser bis zum Tränkungsbeginn.

2.2. Vorbehandlung

92 der durchschnittlich 109 g schweren Versuchstiere wurden im Alter von 40 Tagen 2/3 nephrektomiert. Das Gewicht der resezierten Nieren betrug im Durchschnitt 0,8 g.

Die Nephrektomie wurde vorgenommen, um innerhalb derselben Versuchsreihe eine erhöhte Tumorrate in der Niere zu erzielen (HAGEN, 1977). Da nach 4 Monaten die kompensatorische Regeneration der Restniere beendet ist (HEINE, STÖCKER 1971, MALANGRÉ 1971), kann dieser Eingriff keinen Einfluß auf die Zellproliferation der Milz haben.

+) Fr. FENSKE, Fr. KOHAUT und Fr. SCHINEIS danke ich herzlich für ihre Mitarbeit und freundliche Unterstützung.

2.3. Versuchsanordnung

2.3.1. Vergiftung mit N-Nitroso-Morpholin (NNM)

Die 108 Versuchstiere wurden in 4 Gruppen unterteilt. 4 Monate nach der 2/3 Nephrektomie erhielten 3 Gruppen (92 Versuchstiere) das NNM täglich in Konzentrationen von 6, 12 und 50 mg% ad 20 ml im Trinkwasser.

Je zwei Versuchstiere gleicher Vergiftungsdosis und -dauer wurden aus statistischen Gründen zu einem Paar zusammengefaßt.

17 Tierpaare der mit 6 mg%iger NNM-Lösung getränkten Tiere wurden nach 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 Tagen getötet.

17 Tierpaare der Versuchsgruppe mit 12 mg%iger NNM-Lösung wurden nach 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51 Tagen getötet.

12 Tierpaare der Gruppe mit 50 mg%iger NNM-Lösung wurden 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 Tage nach Tränkungsbeginn getötet.

Die 4. Versuchsgruppe (16 Tiere) diente ohne Vorbehandlung und ohne NNM im Trinkwasser als Kontrollgruppe.

2.3.2. Singuläre Injektionstechnik

Als radioaktiver Vorläufer der DNS-Synthese wurde in unseren Versuchsgruppen ^{3}H-Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 20,2 Ci/Mol (NEN, Chemical GmbH, Frankfurt/M.) verwendet.

Drei Stunden vor der Tötung wurde allen 108 Versuchstieren 0,5 ml ^{3}H-Thymidin und 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Dies entspricht einer Gesamtaktivität von 500 /u Ci ^{3}H-Thymidin pro Tier. Die Injektion der Versuchstiere geschah in einem leichten Ätherrausch.

2.3.3. Tötungszeit und Tötungsart

Drei Stunden nach der Injektion wurden die Tiere jeweils vormittags getötet, um damit tageszeitliche Schwankungen des Markierungs- und Mitose-Indexes (PILGRIM, ERB und MAURER, 1963; PILGRIM et al., 1965; HEINE, W.-D., STÖCKER und HEINE, H.-D., 1970; HEINE, W.-D., 1973) gleichzuschalten.

Die Tötung erfolgt in leichtem Ätherrausch durch Dekapitation.

2.4. Autoradiographische Technik

2.4.1. Herstellung der Autoradiogramme

Sofort nach der Tötung wurde die Milz entnommen und für 48 Stunden in neutralem 10 %igem Formalin bei +4° C fixiert. Dem Formalin war in hoher Konzentration (0,5 mg/ml) inaktives Thymidin zugesetzt worden, um das freie nicht in neugebildete DNS eingebaute ^{3}H-Thymidin auszutauschen.

Nach 24-stündigem Wässern und Durchlauf der üblichen Standardverfahren (aufsteigende Alkoholreihe, Methylbenzoat, Benzol) wurden die Proben in Paraffin eingebettet.

Die 3 - 4 µ dicken, entparaffinierten Schnitte wurden kurz vor der Autoradiographie nochmals mit einer inaktiven Thymidin-Waschlösung gleicher Konzentration wie oben behandelt.

Zur Entwicklung der Autoradiogramme wurde die Stripping-Film-Methode (Kodak AR 10) in Anlehnung an PELC (1947, 1956), MAURER (1959) und SCHULTZE (1968) gewählt. Bei der Stripping-Film-Methode ist eine anschließende Färbung der Präparate durch den Film möglich. Die Färbung der Präparate erfolgte mit Haematoxilin-Eosin.

Die Expositionszeit betrug 10, 20, 21, 40 und 50 Tage.

2.4.2. Auswertung der Autoradiogramme

2.4.2.1. Zonale Einteilung der Milz

In den Milzpräparaten bestimmten wir die Prozentsätze radioaktiv markierter Zellen in folgenden Zonen:

1) Rote Pulpa
2) Weiße Pulpa, die sich aus Follikel-(Keim)-zentrum und der Follikelschale zusammensetzt
3) Follikelrand- oder Marginalzone, d.h. die Übergangszone zwischen weißer und roter Pulpa

Im Gegensatz zu vorausgegangenen Arbeiten (HELPAP et al., 1974; YAMASHITA und HELPAP, 1974; WREDE, 1975; ECKERT, 1976) ist unsere zonale Einteilung modifiziert.

Die Aufteilung der roten Pulpa in eine interfollikuläre und subkapsuläre Zone und der Follikelschale in eine perifollikuläre und periarterioläre Zone wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Da besonders HELPAP und Mitarbeiter bei quanti-

tativen Untersuchungen festgestellt haben, daß die Ergebnisse über die zwei Zonen der roten Pulpa (HELPAP et al., 1974) und der Follikelschale (HELPAP und DACHSELT, 1978) keinen signifikanten Unterschied zeigen.

Unsere Auswertung bezieht sich jeweils nur auf alle Zellen in den verschiedenen Milzzonen, weil eine spezifische Zelldifferenzierung an den Paraffinschnitten der Stripping-Film-Methode nicht exakt möglich ist. (YAMASHITA und HELPAP, 1974)

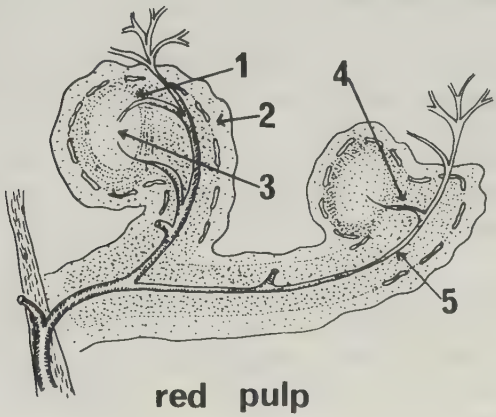

Abb. 1: Zonale Einteilung der weißen Pulpa
(HELPAP, B. und DACHSELT, U., 1978)
1 = perifollicular zone
2 = marginal zone
3 = germinal center
4 = periarteriolar zone
5 = central arteria

2.4.2.2. Markierungsindex

Die Autoradiogramme wurden mit einem Zeiss-Mikroskop bei Ölimmersion und 1600-facher Vergrößerung (100 x 8 x 2,0) ausgewertet.

Mit Hilfe eines Okular-Netz-Mikrometers zählten wir alle im Quadrat liegenden Zellen sowie die rechts und unten angeschnittenen Kerne, während wir die am linken und oberen Rand liegenden vernachlässigten.

Die Expositionszeit wurde unterschiedlich je nach der Qualität der Autoradiogramme ausgewählt. Pro Präparat werteten wir insgesamt 125 Blickfelder aus. Davon wurden 50 Blickfelder in der roten Pulpa und je 25 Blickfelder im Follikel-(Keim)-zentrum, in der Follikelschale und in der Follikelrandzone ausgezählt.

Durch die Bestimmung der Gesamtzellzahl und der markierten Zellen konnte der Markierungsindex in den verschiedenen Milzzonen errechnet werden. Der Markierungsindex ist der Prozentsatz radioaktiv markierter Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl.

Aus diesen Werten ließ sich auch die Zellzahl pro Blickfeld für die einzelnen Milzzonen ermitteln.

2.4.2.3. Mitosen- und Megakaryocytenindex

Bei der Auswertung der Präparate wurden wenige Mitosen und Megakaryocyten gefunden, deshalb war ein Mitosen- und Megakaryocytenindex nicht zu ermitteln.

3. Ergebnisse

3.1. Zur Proliferation der roten Pulpa unter NNM

3.1.1. Markierungsindex

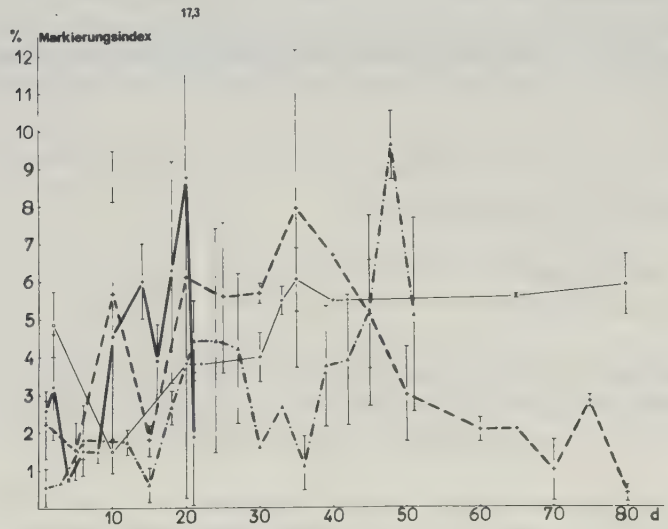

Abb. 2: Markierungsindex der roten Pulpa während der Applikation von N-Nitroso-Morpholin.

. —— . 50 mg%ige Lösung
\+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung
o —— o Kontrollen

Die Abbildung 2 zeigt den Markierungsindex in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der NNM-Applikation bei einer 6, 12 und 50 mg%igen NNM-Lösung und für die Kontrolltiere.

3.1.1.1. Kontrolltiere

Der Ausgangswert der unbehandelten Kontrolltiere liegt am 2. Versuchstag bei 4,9 %. Bis zum 10. Tag erfolgt ein starker Abfall des Markierungsindex auf 1,5 %. Danach setzt ein stufenweiser Anstieg bis zu einem Höchstwert von 6 % am 35. Versuchstag ein.

Das nach 35 Tagen erreichte Markierungsmaximum ändert sich bis zum 80. Versuchstag wenig und verläuft fast plateauförmig.

3.1.1.2. 6 mg%ige NNM-Lösung

Die Markierungsindices dieser vergifteten Tiere weisen erhebliche Schwankungen und steile Zacken auf.

Die Kurve beginnt mit einem Wert von 2,2 %, der bis zum 5. Tag auf 1,5 % abfällt, um wieder auf 5,7 % (10. Tag) anzusteigen und am 15. Tag bei 1,8 % zu liegen.

Vom 15. Tag an kommt es zum Aufwärtstrend mit einer Spitze von 6,1 % (20. Tag), um nach einem muldenförmigen Anstieg den Höchstwert von 7,9 % (35. Tag) zu erreichen. Nach diesem Maximum fällt die Kurve kontinuierlich, mit leichten Schwankungen zwischen dem 60. und 80. Tag, auf den Wert von 0,4 % ab.

3.1.1.3. 12 mg%ige NNM-Lösung

Während der ersten 45 Versuchstage bewegt sich diese Kurve in einer flachen auf- und absteigenden Bewegung, die meist deutlich unter dem Kontrollniveau liegt.

Am 49. Tag allerdings wird ein Maximum von beinahe 10 % erreicht, das das Kontrollniveau um das Doppelte übersteigt.

3.1.1.4. 50 mg%ige NNM-Lösung

Die Markierungsindices der ersten Versuchstage zeigen erhebliche Schwankungen. Am 8. Tag beginnt ein Aufwärtstrend mit einem Spitzenwert bei 6,0 % (14. Tag), der auf 3,9 % absinkt und danach das Markierungsmaximum von 8,7 % (20. Tag) erreicht.

Anschließend erfolgt ein steiler Abfall auf den Wert von 1,8 % (22. Tag).

3.1.1.5. Zusammenfassung

Alle Kurven weisen auffällige Schwankungen auf. Diese lassen sich durch die teilweise extreme Streubreite der individuellen Werte erklären, aus denen für je 2 Versuchstiere der gleichen Gruppe der Mittelwert bestimmt wurde.

3.1.2. Zur Zelldichte der roten Pulpa unter NNM

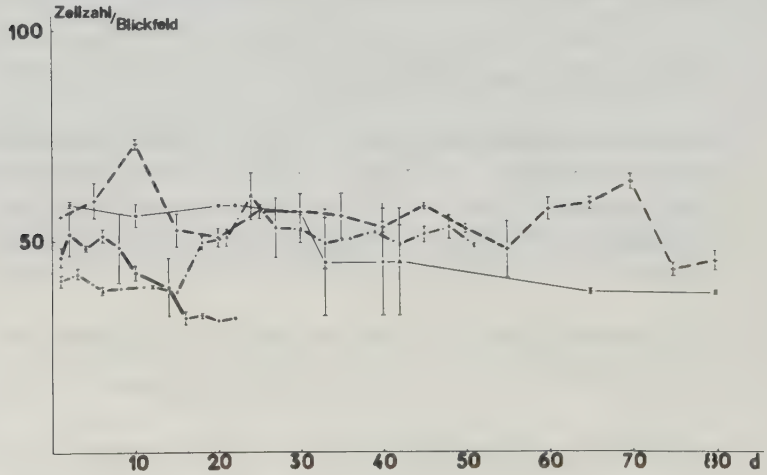

Abb. 3: Zellzahl pro Blickfeld in Abhängigkeit von der Applikationsdauer von N-Nitroso-Morpholin für die rote Pulpa.

. —— . 50 mg %ige Lösung
\+ --- + 6 mg %ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg %ige Lösung
o —— o Kontrollen

Abbildung 3 stellt in der Ordinate die Zellzahl der roten Pulpa in einem definierten Blickfeld dar. Die Zeit nach der Vergiftung ist in die Abszisse eingetragen.

Die Kurven zeigen, daß die Gruppen mit 6 und 12 mg%iger NNM-Lösung im großen und ganzen im Bereich der Kontrollen bleiben.

Nur in der Gruppe der 50 mg%igen Lösung fällt die Zelldichte vom 10. Tag an deutlich ab. Das zeigt eine Verringerung der Zellzahl in definiertem Blickfeld an.

Die deutliche Abnahme der Zelldichte pro Blickfeld bei der 50 mg%igen NNM-Konzentration, die außer in der roten Pulpa auch in der Follikelschale und der Follikelrandzone (vgl. Abb. 7 und Abb. 9) am 10. Versuchstag beginnt, ist ein Zeichen dafür, daß Zellen aus allen Milzzonen verschwunden sind.

Beim Follikelkeimzentrum beginnt die starke Zellabnahme schon am 6. Versuchstag (vgl. Abb. 5). Schon makroskopisch fand man bei den Versuchstieren mit der 50 mg%igen NNM-Konzentration im Trinkwasser ungefähr vom 10. Versuchstag an eine auffällige Milzatrophie. Das beweist, daß schon aufgrund der Milzatrophie ein erheblicher Zellverlust eingetreten ist.

3.2. Zur Proliferation der weißen Pulpa unter NNM

3.2.1. Markierungsindex des Follikel-(Keim)-zentrums

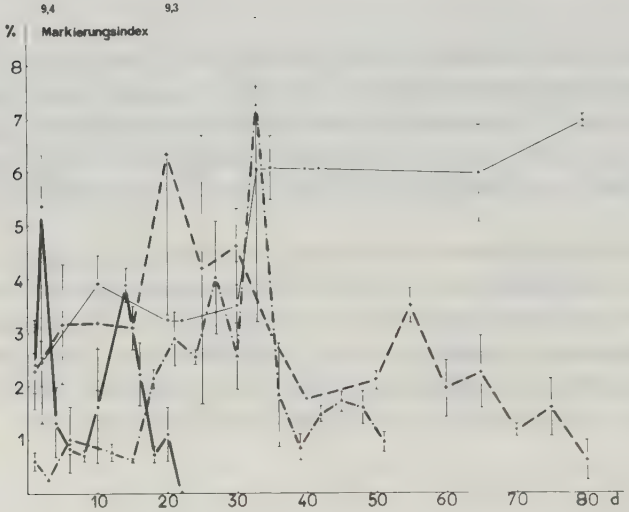

Abb. 4: Markierungsindex des Follikel-(Keim)-zentrums während der Applikation von N-Nitroso-Morpholin.

. —— . 50 mg%ige Lösung
\+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung
o —— o Kontrollen

3.2.1.1. Kontrolltiere

Die Kurve der Kontrolltiere bildet nach einem Anstieg auf 3,9 % (10. Tag) ein erstes Plateau. Am 30. Tag (3,5 %) steigt die Kurve auf den maximalen Wert von 6,0 % (33. Tag). Dieser Markierungsindex bleibt bis zum 80. Tag konstant.

3.2.1.2. 6 mg%ige NNM-Lösung

Diese Kurve zeigt nach den ersten 15 Versuchstagen einen durchschnittlichen Wert von 3,1 %. Danach setzt ein Anstieg bis zum Maximum von 6,3 % am 20. Tag ein. Bis zum 80. Tag tritt ein starker stufenförmiger Abfall ein, der vom 30. Tag an ungefähr um das 2-fache unter die Kontrollwerte absinkt.

3.2.1.3. 12 mg%ige NNM-Lösung

Nach einem kontinuierlichen Aufwärtstrend wird am 33. Tag der Spitzenwert von 7,2 % erreicht.

Anschließend erfolgt wiederum ein steiler Abfall bis um das 3-fache unter die Kontrollwerte.

3.2.1.4. 50 mg%ige NNM-Lösung

Die Kurve zeigt einen U-förmigen schwankenden Verlauf der Werte mit 2 Gipfeln.

Der Höchstwert von 5,4 % liegt am 2. Tag, der andere Spitzenwert von 3,8 % am 14. Tag. Außer den Höchstwerten liegen die anderen Werte deutlich unter dem Kontrollniveau.

3.2.2. Zur Zelldichte des Follikel-(Keim)-zentrums unter NNM

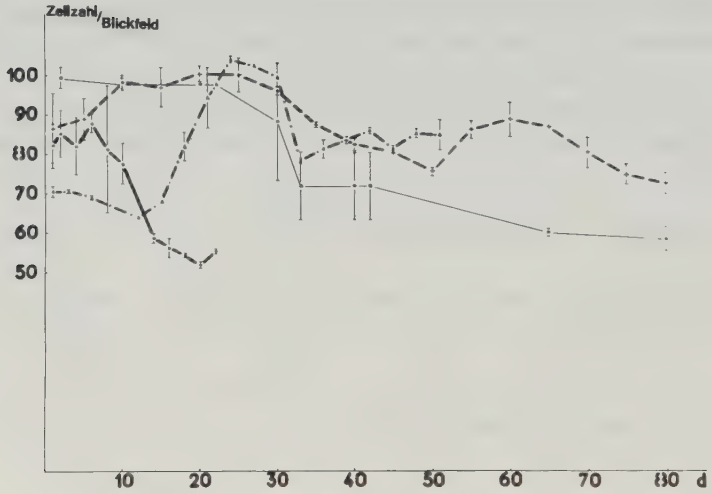

Abb. 5: Zellzahl pro Blickfeld in der Abhängigkeit von der Applikationsdauer von N-Nitroso-Morpholin für das Follikel-(Keim)-zentrum.

. —— . 50 mg%ige Lösung
\+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung
o —— o Kontrollen

Abbildung 5 zeigt die Zellzahl der Follikel-(Keim)-zentren in einem definierten Blickfeld zu der Anzahl der Tage nach Beginn der Vergiftung.

Die Gruppen der 6 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Lösung verlassen das Niveau der Kontrollen nicht wesentlich.

Eine Ausnahme innerhalb der ersten 20 Tage machen die 12 mg-%igen Werte, die um 1/3 unter dem Kontrollniveau bleiben.

Die dick ausgezogene Linie der 50 mg%igen Gruppe zeigt einen Abfall, der um die Hälfte unter dem Kontrollwert liegt.

3.2.3. Markierungsindex der Follikelschale unter NNM

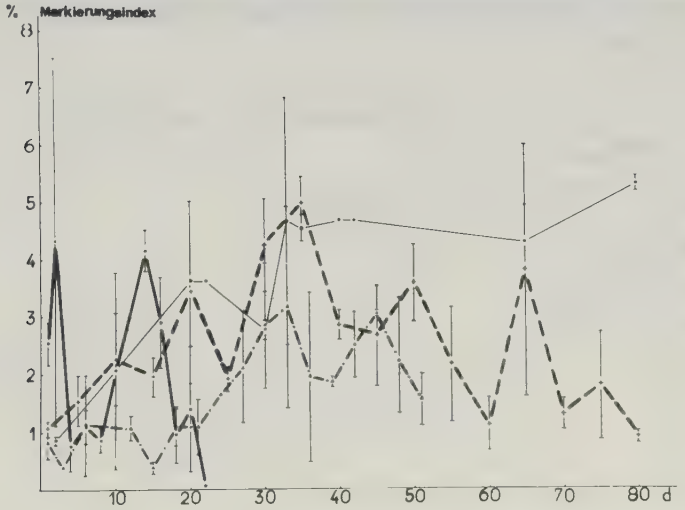

Abb. 6: Markierungsindex der Follikelschale während der Applikation von N-Nitroso-Morpholin.

. —— . 50 mg%ige Lösung
+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung
o —— o Kontrollen

Die Abbildung 6 zeigt, daß die Konzentrationen der 6 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Lösung eine niedrigere Proliferation als

die Kontrollen haben, die vom 35. - 80. Tag besonders deutlich wird. Innerhalb dieses Zeitabschnittes liegen die Markierungsindices etwa um die Hälfte unter den Kontrollwerten.

Auffallend sind auch die individuelle Streuung der Meßwerte und die Schwankungen der Kurven. Nur die Kurve der 50 mg%igen Lösung, die einen sehr ähnlichen Verlauf wie in Abb. 4 hat, durchbricht mit zwei Maxima den Kontrollbereich. Der erste Spitzenwert liegt mit 4,3 % am 2. Tag, der andere mit 4,1 % am 14. Tag.

3.2.4. Zur Zelldichte der Follikelschale unter NNM

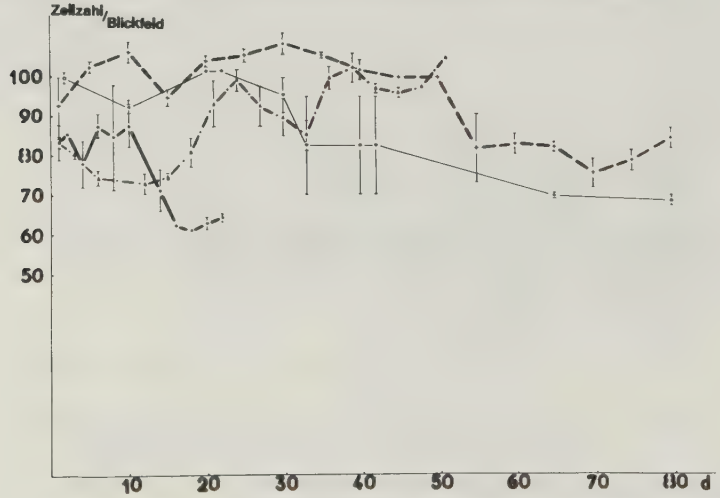

Abb. 7: Zellzahl pro Blickfeld in Abhängigkeit von der Applikationsdauer von N-Nitroso-Morpholin für die Follikelschale.

. —— . 50 mg%ige Lösung
\+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung
o —— o Kontrollen

Von leichten Schwankungen abgesehen, weisen die Kurven der 6 mg%igen und der 12 mg%igen NNM-Lösung keine wesentliche Abweichung vom Kontrollbereich auf. Nach 10 Versuchstagen kommt es bei der Kurve der 50 mg%igen Lösung zu einem Abfall der Zellzahl pro Blickfeld um etwa die Hälfte.

3.3. Zur Proliferation der Follikelrandzone (Übergangszone zwischen weißer und roter Pulpa) unter NNM

3.3.1. Markierungsindex

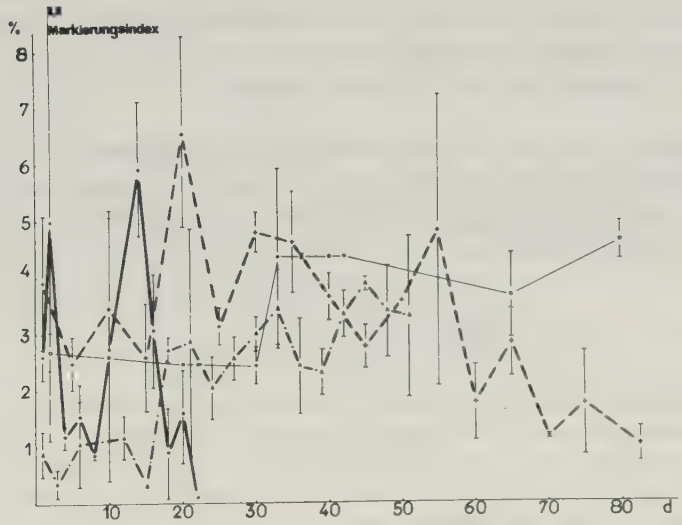

Abb. 8: Markierungsindex der Follikelrandzone während der Applikation von N-Nitroso-Morpholin.

. —— . 50 mg%ige Lösung
+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung
o —— o Kontrollen

3.3.1.1. Kontrolltiere

Der Ausgangswert der unbehandelten Tiere liegt bei 2,7 % (2. Tag). Dieser erreichte Markierungswert verläuft bis zum 30. Tag nahezu plateauförmig.

Danach steigt der Wert auf 4,4 %, um am 31. Tag ein neues Plateau zu erreichen.

3.3.1.2. 6 mg%ige NNM-Lösung

Die Kurve steigt nach zwei kleinen Schwankungen am 15. Tag steil an, um einen Höchstwert am 20. Tag zu erreichen, der das 2 - 3-fache der Kontrollwerte beträgt.

Dann erfolgt bis zum 80. Versuchstag ein schwankender Abwärtstrend, der sich vom 36. Tag an wesentlich unter den Kontrollwerten fortsetzt und schließlich die Hälfte der Kontrollwerte ausmacht.

3.3.1.3. 12 mg%ige NNM-Lösung

Der Verlauf dieser Kurve liegt zunächst stark unterhalb den Kontrollwerten, ab dem 30. Tag leicht oberhalb.

3.3.1.4. 50 mg%ige NNM-Lösung

Bei dieser Konzentration zeigt die Kurve wieder einen beinahe U-förmigen Verlauf mit zwei Spitzen, der sich von den entsprechenden Kurven (Abb. 4 und Abb. 6) kaum unterscheidet. Am 2. Tag liegt der erste Spitzenwert bei 5,0 %, der andere ist mit 5,9 % der Höchstwert (14. Tag).

3.3.2. Zur Zelldichte der Follikelrandzone unter NNM

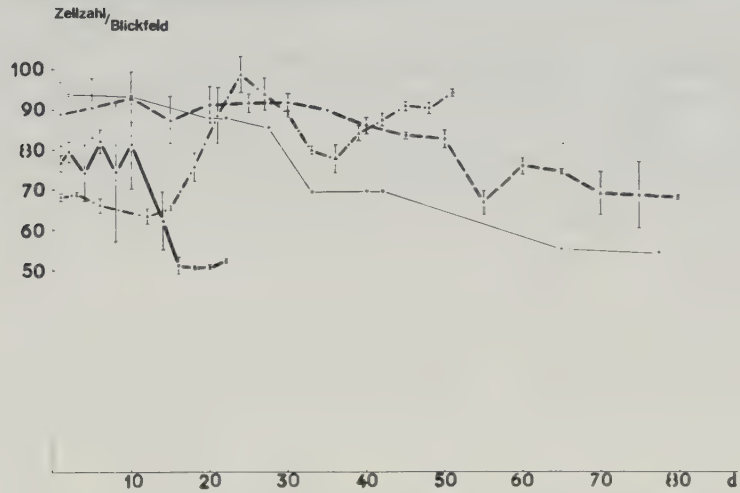

Abb. 9: Zellzahl pro Blickfeld in Abhängigkeit von der Applikationsdauer von N-Nitroso-Morpholin für die Follikelrandzone.

. —— . 50 mg%ige Lösung
\+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung
o —— o Kontrollen

Abbildung 9 zeigt wieder, daß die Gruppen der 6 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Lösung kaum von den Kontrollwerten abweichen.

Die deutliche Verringerung der Zellzahl um die Hälfte pro Blickfeld ist bei der 50 mg%igen Gruppe erneut zu beobachten.

3.4. Zum Trinkverhalten der Versuchstiere unter NNM

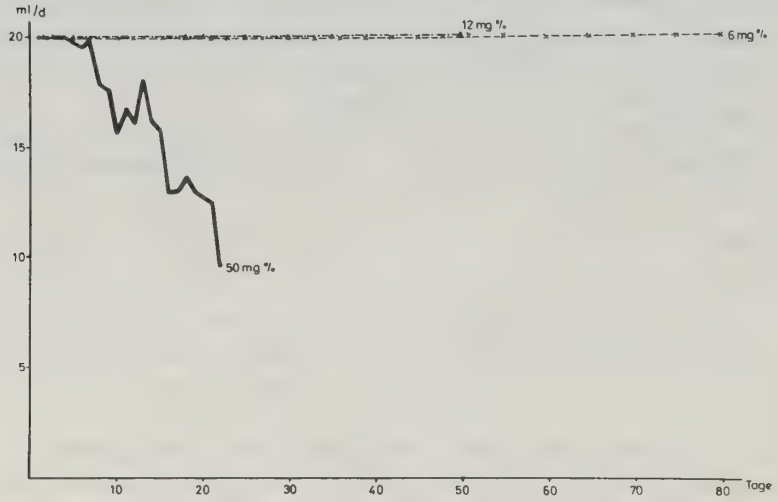

Abb. 10: Trinkverhalten bei verschiedenen N-Nitroso-Morpholin-Konzentrationen.
Ordinate: tägliche Aufnahme von NNM mit dem Trinkwasser

. —— . 50 mg%ige Lösung
+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung

Aus den Kurvenverläufen ist für die Gruppen der 6 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Lösung erkennbar, daß die Versuchstiere die jeweilige NNM-Lösung in 20 ml Flüssigkeit täglich bis zum Versuchsende getrunken haben.

Die Tiere in der Gruppe der 50 mg%igen NNM-Lösung tranken mit der Dauer des Versuchs immer weniger. Am Ende des Versuchsablaufs (21. Tag) wurde nur noch die Hälfte der angebotenen Menge (50 mg ad 20 ml/d) getrunken. Damit wurde im

letzten Versuchsdrittel (14. bis 21. Tag) erheblich weniger NNM-Lösung aufgenommen als vorher.

3.5. Zum Gewicht der Versuchstiere unter NNM

Abbildung 11 stellt in der Ordinate das Gewicht der Versuchstiere in Gramm zu Ende der NNM-Applikation in Abhängigkeit von der Dauer der Tränkung dar.

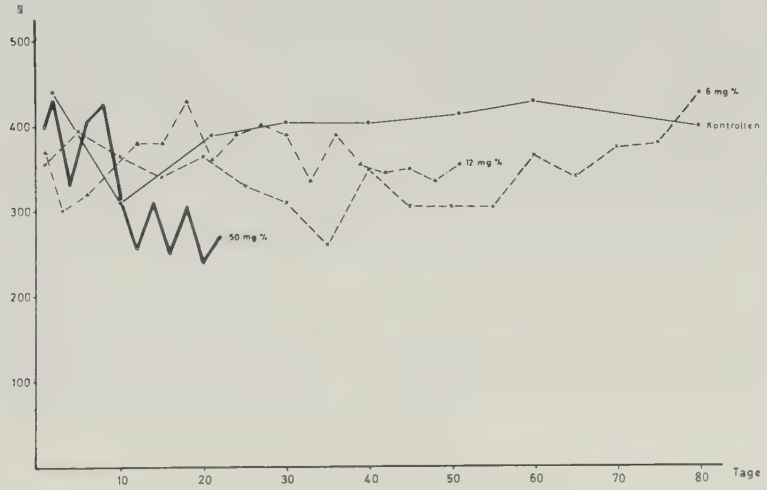

Abb. 11: Gewicht der Versuchstiere in der Abhängigkeit von der Applikationsdauer von N-Nitroso-Morpholin.

. —— . 50 mg%ige Lösung
+ --- + 6 mg%ige Lösung
▲ -.- ▲ 12 mg%ige Lösung
o —— o Kontrollen

Die Versuchstiere der 6 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Lösung zeigen ab dem 30. Tag eine statistisch nicht signifikante Gewichtsreduktion gegenüber den Kontrollen.

Bei den Versuchstieren der 50 mg%igen Lösung sinkt das Gewicht vom 10. Tag an um 1/4 - 1/3 ab.

4. Diskussion

4.1. Kontrollbereich

Die unbehandelten Kontrolltiere erhielten vormittags 3 Stunden vor der Tötung die ^{3}H-Thymidininjektion. Durch diese Methode wurden alle Zellkerne markiert, die sich zum Zeitpunkt der Injektion in der DNS-Synthese befanden. (HEINE, 1973)

Durch die Konstanthaltung unserer Versuchsanordnung (konstante Temperatur, künstlicher Hell-Dunkelwechsel und ^{3}H-Thymidininjektion um 11 ^{00} Uhr vormittags) müßten die Markierungsindices der Kontrolltiere fast eine Parallele zur Abszisse bilden. Das ist in den Kurven der 4 verschiedenen Milzzonen bis zum 30. Tag nicht der Fall. Die Markierungsindices sind unterschiedlich und schwanken von Tier zu Tier beträchtlich.

Nach dem 30. Versuchstag kommt es in allen Kurven zu einem steilen Anstieg auf ein Markierungsmaximum, das dann bis zum 80. Versuchstag plateauförmig verläuft.

Das Plateau liegt für die rote Pulpa und das Follikel-(Keim)-zentrum im Bereich von 5 - 6 % (Abb. 2 und Abb. 4) und für die Follikelschale und Follikelrandzone bei 4 - 5 % (Abb. 6 und Abb. 8).

Der Kontrollbereich wird von den Kurven der mit 6 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Lösung behandelten Tiere nicht überschritten. In einem Fall, nämlich beim Follikel-(Keim)-zentrum, liegen die Markierungsindices sogar um das 2 - 3-fache unter den Kontrollwerten (vgl. Abb. 4). Es kommt also zu keiner Steigerung der Zellneubildung.

Nur die Gruppe der 50 mg%igen NNM-Lösung durchbricht mit durchschnittlich zwei Maxima in allen Milzzonen deutlich den Kontrollbereich.

Eines der auffälligsten Ergebnisse bei der Untersuchung der Kontrolltiere sind die starken Schwankungen der Markierungsindices, die eine Erklärung erforderlich machen.

Welche möglichen Ursachen sind für die erheblichen Schwankungen der Markierungsindices der Kontrolltiere bis zum 30. Tag verantwortlich?

Durch die Konstanz unserer ^{3}H-Thymidininjektion am Vormittag (vgl. 2.3.3.) ist ein Einfluß der tageszeitlichen Schwankung des ^{3}H-Thymidin Markierungsindex (PILGRIM, ERB und MAURER, 1963; PILGRIM et al., 1965; HEINE, W.-D.; STÖCKER und HEINE, H.-D., 1970; 1971; HEINE, H.-D., 1971; HEINE, W.-D., 1973) auf unsere Kontrollmilzen nicht zu erwarten. Die S-Phasendauer der Milz liegt ungefähr bei 7 Stunden (ALTMANN, 1966) und tageszeitliche Schwankungen der S-Phasendauer sind von PILGRIM und Mitarbeitern (1965, 1966) ausgeschlossen worden.

Die Untersuchung der Zellproliferation im Keimzentrum der Rattenmilz mit ^{3}H-Thymidin (FLIEDNER et al., 1964) zeigt, daß folgende Faktoren den ^{3}H-Thymidin Markierungsindex beeinflussen können:

1) Es treten unvermeidliche biologische Differenzen bei der ^{3}H-Thymidininjektion von Tier zu Tier auf, obwohl die Injektionsmenge konstant war.

2) Neben der normalen biologischen Variation muß mit einer "Zellzirkulation" (besonders im Keimzentrum) auf der mikroskopischen Ebene gerechnet werden, die zu weiteren Schwankungen führt.

3) Die Markierungsindices können durch die Reutilisation radioaktiv markierter DNS-Bausteine von zerfallenen Zellen verändert werden. Die Möglichkeit ist besonders groß, wenn man wie FLIEDNER und Mitarbeiter die Tiere in verschiedenen Intervallen (0 - 6, 7 - 12, 13 - 18 und 19 - 24 Stunden) bis einschließlich 7 Tage nach der ^{3}H-Thymidininjektion tötet. Unsere Kontrolltiere wurden 3 Stunden nach der ^{3}H-Thymidininjektion getötet, aber schon nach 1 Stunde ist auch bei unserer Untersuchung mit einer Reutilisation von radioaktiv markierten DNS-Bausteinen zugrunde gegangener Zellen zu rechnen. (HEINE, W.-D., persönliche Mitteilung)

4) Eine weitere Erklärung für die anfänglichen Schwankungen der Markierungsindices unserer Kontrolltiere kann in der Tierhaltung liegen.

Die Tiere wurden in den klimatisierten Institutsställen unter konstanten Versuchsbedingungen gehalten, aber die Tierställe waren nicht keimfrei. Durch latent ablaufende Infektionen ist die Beeinflußung der Markierungsindices der Kontrollmilzen möglich.

Bei viralen und bakteriellen Infektionen kommt es zur Steigerung der RES-Funktion als ersten Abwehrmechanismus. (NOLTENIUS, 1970)
Die Applikation von z.B. Bordetella pertussis führt zu einer gesteigerten Zellproliferation mit Vergrößerung

der Milz (STÖCKER und FINGER, 1972). Da ungefähr ein Drittel des gesamten lymphatischen Gewebes in der Milz ist, sind auch die immunologischen Abwehrmechanismen von Bedeutung. Bei entzündlicher Lebererkrankung, z.B. der akuten Hepatitis, wird durch die Immunproduktion der Milz der Entzündungsvorgang überwunden. (GRAMLICH et al., 1970)
Auf die Frage über die Rolle des RES bei der Immunantwort wird im nächsten Abschnitt eingegangen. Besonders in der Milz liegen das RES und immunkompetente Zellen dicht nebeneinander.

4.2. Veränderungen in der roten Pulpa unter NNM

Das komplizierte Gefäß- und Zellsystem der roten Pulpa der Milz ist erst in den siebziger Jahren durch licht- und elektronenmikroskopische, fermentcytochemische und autoradiographische Untersuchungen besser geklärt worden (BURKE und SIMON, 1970; STUTTE, 1970; 1973; YAMASHITA und HELPAP, 1974).

Die rote Pulpa bildet ein komplexes Hohlraumsystem aus Sinus und Pulpasträngen. Die fermentcytochemischen Untersuchungen von STUTTE (1973) klärten die verschiedenen Enzymmuster der Zellen, die Sinus und Pulpastränge bevölkern. Die Sinuswandzellen enthalten besonders viel Naphthol-AS-acetat-Esterase, aber kaum α-Naphthyl-acetat-Esterase und saure Phosphatose. Im Gegensatz dazu sind in den Reticulumzellen der Pulpastränge und in den Makrophagen der Sinuslumina vorwiegend die α-Naphthylacetat-Esterase und die saure Phosphatose zu finden. Die Naphthol-AS-Esterase ist nicht oder nur in kleinen Mengen nachzuweisen.

Nach STUTTE besitzen nur die Reticulumzellen, die Makrophagen und die in der Milz vorhandenen Blutmonocyten eine starke Phagozytosekompetenz, die Sinuswandzellen dagegen eine sehr schwache.

Dieses System von phagozytierenden Zellen, das über den ganzen Organismus verteilt ist (die Reticulumzellen der Milz, der Leber (Kupffersche Sternzellen), der Lymphknoten, des Knochenmarks und die Endothelien der Gefäße und Lymphbahnen) wurden von ASCHOFF (1924) unter der Bezeichnung des Reticulo Endothelialen Systems (RES) zusammengefaßt.

Die klassischen Ansichten über das RES (ASCHOFF, 1924) wurden durch die Einführung des Konzeptes des "mono-nuklearen Phagocyten-Systems" (MPS) kritisiert und abgelöst (VAN FURTH et al., 1972). Alle mono-nuklearen Phagocyten (Makrophagen) kommen von Stammzellen, Monoblasten, Promonocyten im Knochenmark. Aus der Gefäßbahn emigrierten die Blutmonocyten in das Gewebe und wurden zu Makrophagen. Auch lokalisierte Makrophagen in der Milz, der Lunge, der Leber (Kupffersche Sternzellen) und der Mikroglia stammen nach dem Konzept des MPS von den Blutmonocyten ab (VAN FURTH, 1980).

Im Gegensatz zu den selbständigen Systemen des RES nach ASCHOFF werden im MPS alle phagozytierenden Zellen von den Blutmonocyten abgeleitet. Die Bedeutung der Kooperation von Reticulumzellen bzw. Makrophagen und Endothelien im RES wird durch das Konzept des MPS aufgehoben, weil die Reticulum- und Endothelienzellen ausgeschlossen sind (MÜLLER-HERMELINK und LENNERT, 1978).

Die Überprüfung der Unterschiede zwischen RES und MPS wurde am Beispiel der Kupfferschen Sternzellen der Leber vorgenommen. (BOUWENS und WISSE, 1980; HEINE, 1980) Die Untersuchung

der Kupfferschen Sternzellen unvorbehandelter Ratten der ^{3}H-Thymidinpulsmarkierung (1 Stunde) unter Normalbedingungen beweist, daß die Kupfferschen Sternzellen eine ortsständige Population sind, die sich selbst erhält und erneuert. Erst unter pathologischen Bedingungen, die durch einen starken und akuten Reiz ausgelöst werden, kommt es zur Einwanderung von Monocyten (Makrophagen) aus dem Knochenmark in die Leber. Bei schwachen und chronischen Reizen, z.B. bei vielen menschlichen Lebererkrankungen, ist die lokale Proliferation der Kupfferschen Sternzellen bedeutsamer (HEINE, 1980).

BOUWENS und WISSE bestätigen in einer parallelen Arbeit über die Kupfferzellen die Ergebnisse von HEINE.

Die Makrophagen Population der Leber kann durch normale, akute und chronische Reize auf zwei Wegen gesteigert werden:

1) durch die lokale Proliferation der ortsansässigen Kupfferzellen und

2) durch die Einwanderung der Monocyten. (BOUWENS und WISSE, 1980)

Die drei Autoren stimmen darin überein, daß es zur Zeit nicht sinnvoll ist, den von ASCHOFF geprägten Begriff des RES zugunsten des MPS aufzugeben.

Die autoradiographischen Untersuchungen von YAMASHITA und HELPAP (1974) klärten die Zellzusammensetzung der roten Pulpa. Nach einmaliger ^{3}H-Thymidininjektion sind nach einer Stunde zuerst die großen basophilen Blasten proliferatorisch aktiv. Es folgen die kleinen basophilen Blasten, die basophilen Erythroblasten, die poly- und orthochromatischen Ery-

throblasten. Kaum radioaktiv markiert sind die Reticulum-Zellen ohne Phagozytose. Nach einer Stunde waren die kleinen Lymphocyten, die Plasmazellen, die Reticulum-Zellen mit Phagozytose (Makrophagen), die Endothelien und die segmentkernigen und stabkernigen neutrophilen Leukocyten noch nicht markiert.

Die kleinen Lymphocyten und die Reticulum-Zellen ohne Phagozytose waren zum ersten Mal nach 12 Stunden, die Makrophagen nach 18 Stunden markiert.

Der in unserer Untersuchung für die rote Pulpa ermittelte Kontrollbereich wird kurz vor Ende der jeweiligen Versuchszeiträume von den Gruppen der 50 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Lösung mit deutlichen Maxima verlassen (vgl. Abb. 2).

Die Kurve der 50 mg%igen NNM-Lösung erreicht nach 20tägiger Tränkungsdauer das Maximum bei fast 9 % einen Tag vor Versuchsende. Bei der 12 mg%igen NNM-Lösung wird das Maximum von beinahe 10 % nach 48-tägiger Tränkungsdauer drei Tage vor Versuchsende erreicht.

Die Kurve der mit 6 mg%igen NNM-Lösung getränkten Tiere bildet eine Ausnahme. Ungefähr bei der Hälfte der Versuchsdauer liegt ihr Markierungsmaxima bei 8 %. Anschließend fällt die Kurve deutlich unter den Kontrollbereich ab.

Die verzögerte Zunahme DNS-synthetisierender Zellen könnte auf eine kumulative Wirkung des NNM hinweisen, wodurch die Aussage von DRUCKREY, daß die Carcinominduktion durch chemische Carcinogene eine Kumulationswirkung ist, gestützt würde. (DRUCKREY und KÜPFMÜLLER, 1949; DRUCKREY, 1967)

Für die verschiedenen Zellpopulationen in der roten Pulpa müssen wir unterschiedliche Einflüsse des NNM auf die Zellveränderung und Zellproliferation diskutieren.

Die parallele Untersuchung innerhalb derselben Versuchsreihe an den Sinuswandzellen bzw. Kupfferschen Sternzellen der Leber (BRAUN, 1976), die ein integrierender Bestandteil des RES sind (ALTMANN und KLINGE, 1974), zeigt, daß es bei der Applikation von NNM in allen Konzentrationen zu einer deutlich gesteigerten Zellproliferation kommt. Von Versuchsbeginn an übersteigen die Markierungsindices sehr deutlich den Kontrollbereich. Die höchsten Markierungsindices werden auch gegen Ende der Versuchszeiträume erreicht.

Aufgrund dieser Untersuchung von BRAUN ergibt sich, daß die Applikation von NNM zu einer toxischen Leberepithelzellenschädigung bis hin zur Nekrose führt. Die bestimmten Markierungsindices der Sinuswandzellen der Leber weisen auf eine dosisabhängige Zunahme der Zellneubildungsrate hin. Besonders bei der 50 mg%igen NNM-Lösung kommt es zur Steigerung der Zelldichte der Sinuswandzellen in einem definierten Blickfeld, die in direkter Beziehung zur Leberzellnekrose steht. (BRAUN, 1976; HEINE, 1980)

Bevor wir eine analoge Wirkungsweise des NNM in den Zellen der roten Pulpa annehmen, bleibt die Frage offen, in welcher reaktionsfähigen Form das NNM in der Milz angreift. Bei der hohen Stoffwechselaktivität der Leber ist ein reaktionsfähiger Metabolit zu erwarten. Die toxische Schädigung des Leberparenchyms durch die 50 mg%ige NNM-Lösung kann durch die Steigerung des Pfortaderdruckes zum Umgehungskreislauf führen, über den das NNM direkt in die Milz gelangt.

In Analogie zur toxischen Wirkung des NNM in den Leberepithelzellen (BRAUN, 1976) müßte es in der roten Pulpa der Milz zu erheblichen Zellnekrosen kommen, die einen Parenchymverlust verursachen. Tatsächlich führt die Gifteinwirkung bei der 50 mg%igen NNM-Konzentration im Trinkwasser zu einer deutlichen Verminderung der Zellzahl in einem definierten Blickfeld (vgl. Abb. 3). Bei den anderen Konzentrationen allerdings bleibt die Zellzahl pro Blickfeld im Kontrollbereich. Dieses Ergebnis unterscheidet sich auffällig von der Steigerung der Zelldichte der Sinuswandzellen der Leber als Reaktion auf die Zellnekrose (BRAUN, 1976). Diese extreme Steigerung der Sinuswandzellen bzw. Kupfferschen Sternzellen liegt in ihrer Fähigkeit begründet, auf einen Reiz mit einer starken lokalen Proliferation zu antworten (HEINE, 1980).

Die Zellneubildung der roten Pulpa wird normalerweise einmal von der ortsständigen Proliferation getragen (HELPAP et al., 1974), zum anderen von der Einwanderung von Zellen (z.B. von Makrophagen und Lymphocyten aus dem Knochenmark (YAMASHITA und HELPAP, 1974). Bei einem Rückgang der Zellneubildungsrate, die hier vorliegt, kann man annehmen, daß entweder die ortsständige Zellproliferation gehemmt wird oder die Einwanderung von Zellen abnimmt.

Bei der histologischen Untersuchung der Präparate der roten Pulpa fanden wir keine Zellnekrosen. Damit scheidet das reparative Wachstum (HEINE, 1973), wie wir es analog bei der Leberepithelzelle finden (BRAUN, 1976), das auf einen toxischen Zellverlust reagiert, bei unserer Untersuchung aus.

Es läßt sich nicht ausschließen, daß Zelluntergänge stattfinden, da es möglicherweise zu einer Aktivierung der Makrophagen in der roten Pulpa kommt. Die Zellnekrosen würden

durch die Makrophagen abgeräumt und würden aus dem mikroskopischen Blickfeld verschwinden. Die Makrophagen vermögen auf verschiedenartige Reize hin ihre phagozytäre und enzymatische Leistungsfähigkeit ganz erheblich zu steigern und z.T. auch in Proliferation überzugehen. (COTTIER et al., 1980)

Aufgrund der autoradiographischen Untersuchung von YAMASHITA und HELPAP (1974) sind die Makrophagen erst 18 Stunden nach einer einmaligen ^{3}H-Thymidininjektion zu 3 % radioaktiv markiert. Da es nur einen geringen Prozentsatz ortsständiger Makrophagen gibt, sind die meisten in die rote Pulpa eingewandert. Bis zum 6. Versuchstag steigen die Prozentsätze durch die weitere Einwanderung radioaktiv markierter Makrophagen auf 19 % an. Unsere Versuchstiere wurden 3 Stunden nach der ^{3}H-Thymidininjektion getötet, so daß in den ersten 3 Stunden, wenn überhaupt, nur ein geringer Prozentsatz der ortsständigen Makrophagen markiert sein kann.

Der schwankende Anstieg der Markierungsindices in der roten Pulpa bis zu einem Maxima gegen Versuchsende ließ sich mit YAMASHITA und HELPAP gut in Verbindung bringen. Wenn man annimmt, daß die Steigerung der Markierungsindices bei 50 mg-%iger und 12 mg%iger NNM-Lösung durch eingewanderte Makrophagen zustandekommt.

In dieses Bild fügt sich nicht die Kurve der 6 mg%igen NNM-Lösung (vgl. Abb. 2). Ungefähr in der Hälfte (35. Tag) der 80tägigen Versuchsdauer wird das Maximum bei 8 % erreicht. Danach erfolgt ein steiler Abstieg der Kurve und vom 50. bis zum 80. Versuchstag liegen die Markierungsindices fast um die Hälfte unter dem Kontrollbereich. Um eine Erklärung für diesen Sachverhalt zu finden, sind Überlegungen über die Funktion der Lymphocyten und die Wechselwirkung zwischen Makrophagen und Lymphocyten nötig.

Neben den Makrophagen des RES kommen die kleinen Lymphocyten in der roten Pulpa vor. Die kleinen Lymphocyten bestehen aus funktionell unterschiedlichen Typen von immunkompetenten Lymphocyten (T- und B-Lymphocyten), die untereinander erhebliche Wechselwirkungen haben.

Die T-Lymphocyten (thymusabhängige) kommen nach einer komplexen Differenzierung aus dem Thymus und sind als langlebige (mehrere Jahre), rezirkulierende T-Zellen für die zellgebundene Immunreaktion verantwortlich.

Die B-Lymphocyten stammen entweder aus dem Knochenmark (B = bone Marrow) oder aus den bursa-äquivalenten Organen (B = bursa-äquivalent), wobei über den exakten anatomischen Ursprungsort der B-Zellen bis jetzt nichts ausgesagt werden kann. Die B-Lymphocyten sind ortsständiger als die T-Lymphocyten und ihre Lebenszeit ist kürzer (wenige Tage bis zu mehreren Monaten). Die B-Lymphocyten vermitteln die humorale Immunität (vgl. FISCHER, R., 1975; MÖLLER, 1976; WIGZELL, 1976; ZIMMERMANN et al., 1975).

Es wurde auch nachgewiesen, daß die kleinen Lymphocyten keine obligaten Endzellen sind. Bei der Stimulation durch ein Antigen oder durch einen neoplastischen Prozeß kommt es zur Transformation und Zellteilung mit der Entwicklung grosser T- und B-Immunoblasten, aus denen kleine Effektor-Lymphocyten oder Plasmazellen entstehen (vgl. MÜLLER-HERMELINK und LENNERT, 1979).

Inzwischen hat sich gezeigt, daß viele Antigene komplexe immunologische Reaktionen auslösen, wobei die Wechselwirkung zwischen T- und B-Lymphocyten und Makrophagen eine besondere Rolle spielt (FISCHER, H., 1976; GERSHON und METZLER, 1979; COTTIER et al., 1980).

Die kleinen Lymphocyten der roten Pulpa werden als Thymus-unabhängige Lymphocyten angesehen, die zum größten Teil aus dem Knochenmark einwandern (BRAHIM et al., 1970; CRADDOCK et al., 1971 a; b; PARROTT et al., 1971).

Die rezirkulierenden T-Lymphocyten sammeln sich in der periarteriolären Zone der Milz an, um über den Sinus der roten Pulpa in den Blutkreislauf zu gelangen. (FISCHER, R., 1975) So ist anzunehmen, daß sich in der roten Pulpa wie in den anderen Milzzonen Gemische von T- und B-Lymphocyten befinden, auch wenn in der jeweiligen Struktur der eine oder andere Zelltyp mehr überwiegt. (COTTIER et al., 1973)

Die Ursache für das signifikante Absinken der Markierungsindices um fast die Hälfte unter das Kontrollniveau (50. - 80. Tag) bei der 6 mg%igen NNM-Konzentration könnte durch eine Hemmung der Makrophagen bedingt sein. Die Makrophagen, die ein Antigen endozytieren oder abbauen, sind in der Lage, es in einer teilweise verstärkten immunogenen Form an ihre Oberfläche zu lagern, was für das Ablaufen einer optimalen Immunantwort wichtig ist. Durch die Kontaktnahme zwischen T-Lymphocyten und Makrophagen, die vermutlich durch einen sog. "cell interaction factor" (CIF) eingeleitet wird, kommt es zur Freisetzung des Immunogens. Das Immunogen stimuliert die Lymphocyten, die dann eine Reihe von sog. Lymphokinen produzieren. Für unseren Zusammenhang ist dabei der sog. "migration inhibitory factor" (MIF) von Bedeutung, der die Makrophagen in ihrer Wanderungsfähigkeit, nicht aber in ihrer Phagozytosefähigkeit hemmt.

Die enge räumliche Verbindung zwischen Makrophagen und Lymphocyten in der Milz läßt vermuten, daß die von aktivierten Makrophagen freigesetzten sog. Monokine einen modulierenden

bzw. hemmenden Einfluß auf die Lymphocyten ausüben, was für die Lymphocyten in der weißen Pulpa und die Mischzellpopulation in der Follikelrandzone von Bedeutung sein kann. (COTTIER et al., 1980)

4.3. Follikelrandzone

Die Follikelrandzone ist die Übergangszone zwischen weißer und roter Pulpa. An den Lymphocytenwall der Follikelschale schließt sich ein Saum von größeren lymphoiden Zellen an, die Marginalzonenzellen. Die Follikelrandzone hat die Aufgabe einer Blutfilterstation und stellt die Kontaktzone zur roten Pulpa her. In dieser Übergangszone liegen sog. Hülsenkapillaren, das sind Arteriolen, deren Hülsen Phagozytoseaktive Reticulum-Zellen (Makrophagen) darstellen. (STUTTE, 1970 und 1973; LENNERT, 1975)

In der Follikelrandzone sind wenige ortsständige proliferierende Zellen vorhanden, vielmehr setzt sich der größte Teil aus durchwandernden Zellen zusammen. (HELPAP et al., 1974)

In der Follikelrandzone beträgt der Kontrollwert für ein 1. Plateau bis zum 30. Tag ungefähr 3 %. Vom 31. Versuchstag bis zum 80. Versuchstag bildet ein 2. Plateau einen Wert zwischen 4 - 5 %. Die Kurven der 6 mg%igen und 50 mg%igen Gruppen erreichen jeweils ein Maximum (20. und 14. Versuchstag), das zwischen 6 % und 6,5 % liegt (vgl. Abb.8). Anschließend fallen bei beiden die Markierungsindices unter den Kontrollbereich. Bei der 6 mg%igen Gruppe liegen sie gegen Versuchsende um die Hälfte unter dem Kontrollni-

veau. Die Kurve der 12 mg%igen Gruppe verläßt mit keinem Markierungsindex deutlich den Kontrollbereich.

Da in der Follikelrandzone ein erheblicher Durchfluß von Zellen stattfindet, könnten die beiden Maxima durch die Einwanderung an anderer Stelle markierter Zellen (z.B. Lymphocyten aus der Follikelschale) entstanden sein.

Der Vergleich mit den 50 mg%igen und 6 mg%igen Kurven der Follikelschale an den entsprechenden Versuchstagen stützt unsere Aussage. Die 50 mg%ige Kurve der Follikelschale verläßt am 14. Versuchstag gerade den Kontrollbereich mit einem Markierungsindex von 4 %. Die 6 mg%ige Kurve bleibt am 20. Versuchstag knapp unter dem Kontrollbereich von 3 %, d.h. der Markierungsindex ist gegenüber der Follikelrandzone fast um die Hälfte kleiner (vgl. Abb. 6).

Unter der Einwirkung von NNM fällt in der Follikelrandzone bei allen Konzentrationen, wenn auch zu verschiedenen Zeitpunkten, eine Verringerung der Markierungsindices gegenüber dem Kontrollbereich auf. Am deutlichsten zeigt dies die 12 mg%ige und die 6 mg%ige Gruppe gegen Ende der Versuchstage (vgl. Abb. 8). Die Hemmung der Proliferation entsteht vielleicht dadurch, daß das NNM durch eine Zellschädigung eine besondere Reaktionsweise der Makrophagen wie in der roten Pulpa provoziert (vgl. 4.2.).

4.4. Veränderungen in der weißen Pulpa unter NNM

Die weiße Pulpa der Milz setzt sich aus Arealen zusammen, die sowohl B- und T-Lymphocyten enthalten. Das Follikel-(Keim)-zentrum und die Follikelschale (Lymphocytenwall) sind vorwiegend von den kurzlebigen B-Lymphocyten besiedelt. Um die Zentralarterien der weißen Pulpa (periarteriolläre Zone) lagern die langlebigen T-Lymphocyten (vgl. Abb.1). (CRADDOCK et al., 1971 a; b; PARROT und SOUSA, 1971; MITCHELL 1972 und 1973)

In der periarteriolären Zone und Follikelschale findet eine starke Rezirkulation statt, wodurch nur wenige ortsständige proliferierende Zellen zu erwarten sind. In beiden Zonen sind keine reinen B- oder T-Zellen Populationen zu erwarten, sondern vielmehr gemischte Populationen. Der Charakter der Zonen wird durch das Überwiegen von B- oder T-Zellen determiniert (COTTIER et al., 1973).

Dagegen ist die Rezirkulation in den Follikelzentren gering, was auf eine höhere Proliferation ortsständiger Zellelemente hinweist. (HELPAP et al., 1974; LENNERT, 1975)

Die Mischpopulationen von B- und T-Lymphocyten und Makrophagen in der Milz, die als einziges lymphoreticuläres Organ direkt am Blutkreislauf angeschlossen ist, sind für die erste Immunantwort bei im Blut auftretender Antigene verantwortlich. (MELLBYE, 1970)

Unter diesen Zellen und ihren freigesetzten Produkten finden bei Antigenstimulation komplexe Wechselwirkungen statt, wobei eine zellgebundene aber auch eine humorale Immunantwort eintreten kann.

Welche spezifische Immunantwort sich durchsetzt, ist von der Struktur des Antigens, der Antigendosis, der Applikationsweise und vom Abbaumechanismus im Organismus abhängig. (FISCHER, R., 1975)

In dieser Arbeit können wir keine Aussage über die Struktur des NNM als Antigen und seinen Abbauvorgang machen. Nur aus unseren 3 verschiedenen Dosierungen des NNM ist eine starke cytotoxische Reaktionsweise besonders im Follikel-(Keim)-zentrum feststellbar. Die Frage bleibt offen, ob es sich hier um eine spezifische cytotoxische Immunreaktion handelt. Bestimmte Medikamente können durch die Anlagerung an die Oberfläche von Blut- und Gewebszellen cytotoxische Antikörper hervorrufen, die zu einer Zell- oder Gewebsschädigung führen oder die Phagozytose der Makrophagen in der Milz steigern (FISCHER, R., 1975). Cytotoxische Medikamente wie alkylierende Substanzen (auch die N-Nitrosoverbindungen, z.B. Dimethylnitrosamin, gehören zur Gruppe der alkylierenden Verbindungen (PEGG, 1978)), Antimetaboliten und Antibiotika greifen je nach ihrer chemischen Wirkung hemmend in den Zellzyklus ein. Sie hemmen vorwiegend die S-Phase (DNS-Synthesephase), die G_2-Phase (praemitotische Ruhephase) und die M-Phase (Mitose), wodurch besonders schnell proliferierende Gewebe stark betroffen sind. (MIESCHER et al., 1975; NEUMANN, 1975)

Die Milz zählt zu den schnellproliferierenden Geweben (BIZZOZERO, 1893), wobei in jedem Generationszyklus viele Zellen in der S-Phase und M-Phase vorkommen. Die S-Phase dauert ungefähr 7 Stunden, der gesamte Generationszyklus 10 - 14 Stunden (ALTMANN, 1966).

Die parallele Untersuchung der Leber (BRAUN, 1976) und der Niere (HAGEN, 1977) innerhalb derselben Versuchsreihe zweier Organe, die beide zu den stabilen Elementen zählen, zeigte, welche Wirkung das NNM auf den Generationszyklus hat. BRAUN (1976) stellte bei der Applikation von NNM keine Veränderung der S-Phasen-Dauer fest. Die Leberepithelzelle bildet bei den Teilphasen G_2 und M eine Ausnahme, wo es unter NNM wahrscheinlich zu einer Störung kommt. Bei der Arbeit über die Niere (HAGEN, 1977) bleibt der Generationszyklus in den Teilphasen (G_o = Funktionsphase; G_1 = praeparative Phase; S = DNS-Synthesephase; G_2 = praemitotische Ruhephase; M = Mitose) unter NNM ziemlich konstant.

Nach unserer Untersuchung muß das NNM in der weißen Pulpa der Milz wie ein unspezifisches Immunsuppressivum wirken.

Im Follikel-(Keim)-zentrum, wo normalerweise eine hohe ortsständige Proliferation herrscht, wird der vom 30. bis 80. Versuchstag ermittelte Kontrollwert von 6 % von keinem Markierungsindex überschritten. Im Gegenteil, besonders bei der 6 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Konzentration tritt eine starke Hemmung der Proliferation ein. Die Markierungsindices der 6 mg%igen Gruppe liegen um das 2-fache, die der 12 mg%igen Gruppe um das 3-fache unter dem Kontrollbereich (vgl. Abb.4).

Für die Follikelschale, wo der Kontrollbereich zwischen 4 - 5 % liegt, ist die Proliferationshemmung nicht so drastisch. Die ermittelten Markierungsindices befinden sich teilweise im Kontrollbereich, was durch die Rezirkulation in der Follikelschale bedingt sein kann. Auch sind die Werte der 6 mg%igen und 12 mg%igen Gruppe gegen Versuchsende deutlich unter dem Kontrollniveau (vgl. Abb. 6). Bemerkenswert ist

auch hier, daß in den Milzzonen kaum Mitosen beobachtet wurden, was durch eine immunsuppressive Wirkung des NNM bedingt sein könnte.

Die Ergebnisse von SCHERF (1972) über die immunsuppressive Wirkung von NNM unterstützt unsere Aussage. SCHERF behandelte 5 Ratten mit 4 N-Nitrosoverbindungen und untersuchte ihre Immunreaktion im Plague-Test nach JERNE. Dieser Test erfaßt die Initialphase der humoralen Immunreaktion auf cellulärer Basis und dadurch werden Schäden am immunkompetenten System der Versuchstiere meßbar (SCHERF, 1972).

Für das N-Nitroso-Morpholin ergab sich bei den wöchentlich mit 5 % der DL 50 (d = 16 mg/kg/Woche) über 18 Wochen behandelten Tiere eine statistisch sichere immunsuppressive Wirkung. Die applizierte Gesamtdosis betrug für die 18 Wochen 288 mg/kg.

Nach der Umrechnung der für die 6 mg%igen und 12 mg%igen Gruppen ermittelten Gesamtdosis von mg in mg/kg ergibt sich im Vergleich mit SCHERF folgende Tabelle:

Für SCHERF:

16 mg/kg/Woche x 18 Wochen = 288 mg/kg Gesamtdosis

Für unseren Versuch:

bei 6 mg%:

8,4 mg/kg/Woche x 11,4 Wochen = 277 mg/kg Gesamtdosis

bei 12 mg%:

16,8 mg/kg/Woche x 7,3 Wochen = 340 mg/kg Gesamtdosis

Aus dieser Tabelle wird deutlich, daß bei 6mg%iger und 12 mg-%iger NNM-Konzentration die immunsuppressive Wirkung des NNM bei der Proliferationshemmung eine Rolle spielen muß.

Der Wirkungsmechanismus des NNM als unspezifisches Immunsuppressiva ist nicht geklärt.

Vorstellbar ist, in Analogie zur Reaktionsweise anderer immunsuppressiver Stoffe, daß das NNM in die zelluläre Wechselwirkung zwischen Makrophagen, B- und T-Lymphocyten eingreift. Dabei ist an eine Behinderung oder Hemmung der Phagozytose, an eine Blockierung der Lymphocytenoberfläche oder an eine cytotoxische Wirkung auf die Lymphocyten zu denken. (MIESCHER et al., 1975)

Die weitere Darstellung knüpft an die Wechselwirkung zwischen T-Lymphocyten und Makrophagen in der roten Pulpa an (vgl.4.2.). In allen von uns untersuchten Milzzonen sinkt die Zellzahl pro Blickfeld vom 10. Tag an bei der 50 mg%igen Gruppe eindeutig ab, was auf eine numerische Abnahme der Zellen hinweist (vgl. 3.1.2., S. 13). Dieser Befund könnte Indiz dafür sein, daß die Phagozytoseaktivität der Makrophagen durch NNM nicht gehemmt wird.

Der sog. "migration inhibitory factor" (MIF) hemmt zwar die Wanderungsfähigkeit der Makrophagen, aber gleichzeitig aktiviert er sie. Diese aktivierten Makrophagen setzen wahrscheinlich Monokine frei, die einen aktivierenden (u.a. "Lymphocyten-aktivierender Faktor" (LAF)) und einen hemmenden Einfluß (u.a. Protaglandin E_2) auf die Lymphocyten haben.

Auch wenn die Kenntnisse über den dargestellten Sachverhalt noch lückenhaft sind (COTTIER et al., 1980), für unsere vorgelegten Befunde bieten sie eine orientierende Interpretation an.

4.5. Zur Rhythmik der Zellproliferation unter NNM

Die in unserer Untersuchung auftretenden Schwankungen der Markierungsindices in allen Milzzonen (Abb. 2; 4; 6; 8) sind auffällig, da alle Versuchstiere während der Vormittagsstunden getötet wurden, um tageszeitliche Schwankungen der Zellproliferation auszuschalten.

Trotz der Konstanthaltung der Versuchsbedingungen traten schon bei den unbehandelten Kontrolltieren Schwankungen der Markierungsindices in den ersten Versuchstagen auf, deren mögliche Ursache wir unter 4.1. erklärten.

Der hohe Zellumsatz in der Milz, wodurch viele Zellen in der S-Phase und M-Phase vorkommen, könnte durch eine toxische Wirkung des NNM gestört werden. An den basophilen Blasten der roten Pulpa läßt sich die extreme Proliferation der Milz aufzeigen.

Die S-Phasendauer der Blasten beträgt zwischen 5 - 9 Stunden und für die G_2-Phase wird weniger als eine Stunde angenommen, da schon nach einer Stunde markierte Mitosen beobachtet wurden. (YAMASHITA und HELPAP, 1974)

Während PILGRIM und Mitarbeiter (1965, 1966) tageszeitliche Schwankungen der S-Phasendauer ausschließen, weist STÖCKER (1966) darauf hin, daß die G_2-Phase auch in schnell proliferierenden Geweben stärkeren Schwankungen unterliegt.

Dieser circadiane Rhythmus könnte durch die toxische Wirkung des NNM oder seines Metaboliten gestört werden, wodurch in den Versuchstieren die Markierungsmaxima zu unterschiedlichen Tageszeiten eintreten und bei konstanter tageszeitlicher Tötung diese Schwankungen der Markierungsindices bedingt sind.

Diese Aussage wird durch die gleichen Befunde an der Leber (BRAUN, 1976) und an der Niere (HAGEN, 1977) gestützt.

Neben der Beeinflußung des circadianen Rhythmus in der Milz müssen wir beachten, daß die Frage nicht sicher geklärt ist, in welcher Reaktionsweise das NNM auf die Makrophagen, T- und B-Lymphocyten wirkt. Eine Störung dieser komplexen Wechselwirkung führt möglicherweise auch zu Schwankungen der Markierungsindices.

4.6. Mögliche Wechselwirkung zwischen Tumorentstehung und Immunsystem

SCHMÄL (1972, 1973) gliedert den Cancerisierungsprozeß in zwei Teilvorgänge, die ihrem Wesen nach nichts miteinander zu tun haben. Der erste Schritt umfaßt den Umwandlungsprozeß der normalen Zelle zur Krebszelle, der sich auf der zellulären Ebene ereignet.

Der zweite Schritt beinhaltet die Vermehrung der vorhandenen Krebszelle zur klinisch manifesten Geschwulst.

BANNASCH (1979) beschreibt anhand der durch NNM induzierten hepatozellulären Carcinogenese die präneoplastischen Stadien auf der zellulären Ebene (vgl. Einleitung). Im Gegensatz zu SCHMÄL nimmt er mit großer Wahrscheinlichkeit an, daß diese neoplastische Zelltransformation in eine gut- oder bösartige Geschwulst übergehen kann. Nach HEINE und Mitarbeitern (1979) kommt es zur frühzeitigen Veränderung der Susceptibilität der einzelnen präneoplastischen Zellen für normale Wachstumsimpulse. Die präneoplastische Zelle erlangt einen Proliferationsvorteil, was zum Durchlaufen mehrerer Zellzyklen führt, die zur Realisation des Carcinoms entscheidend sind. Auf der

anderen Seite wird die unveränderte Restpopulation der Zellen durch den Proliferationsvorteil der präneoplastischen Zellen am Wachstum gehindert.

Auffallend ist, daß die präneoplastischen Zellveränderungen anscheinend ohne jeden Einfluß des Immunsystems ablaufen. Diese Beobachtung wird durch die eigenständig einsetzende ortsständige Proliferation der Kupfferschen Sternzellen gestützt, die entweder durch einen Reiz aus dem Blutstrom oder durch NNM induzierte Leberzellnekrosen provoziert wird. (HEINE, 1980)

In unserer Untersuchung ist eine exakte Klärung der einzelnen Zellveränderungen in der Milz unter der Applikation von NNM nicht möglich. Nur die immunsuppressive Wirkung des NNM besonders im Follikel-(Keim)-zentrum (vgl. Abb. 4) deutet vielleicht einen Einfluß auf die immunkompetenten Zellen an.

Nach SCHERF (1972) wirkt das NNM in carcinogenen Dosen als schwaches Immunsuppressivum. Aber einen Zusammenhang zwischen carcinogener und immunsuppressiver Wirkung besteht nach seiner Meinung nicht.

Die Applikation von 1,3 mg/kg NNM pro Woche (SCHERF, 1972) reicht aus, um in Ratten bösartige Tumoren zu erzeugen. PREUSSMANN (1974) weist darauf hin, daß schon 1 mg/kg NNM ausreichen. Diese berechnete kleinste krebserzeugende Dosis wurde in dieser Arbeit weit überschritten.

Aus diesem Grunde ist unsere Vermutung berechtigt, ob das carcinogene NNM im lymphatischen Gewebe der Milz nicht ein Malignes Lymphom erzeugen könnte, das mit dem Bild einer lymphatischen Leukämie einhergeht.

Nach der Klassifikation von GALL und RAPPAPORT wird die lymphatische Leukämie bei Versuchstieren als Malignes Lymphom (lymphocytischer Typ) bezeichnet. Durch die RAPPAPORTsche Klassifikation der malignen Lymphome bei Tieren ist es möglich geworden entsprechende Tumoren des Menschen zu klassifizieren. (vgl. KRÜGER, 1979)

In diesem Zusammenhang sind Neoplasien der Zellen des Immunsystems, besonders die Non-Hodgkin-Lymphome, zu nennen. (LENNERT, 1978; LUKES, 1979; PARKER, 1979)

Es ist abzuwarten, ob die exakte immunologische Feststellung des Reifegrades maligner Lymphocyten, über Ort und Zeitpunkt des Ereignisses aufklärt, das zur malignen Transformation führt. (KRÜGER, 1979)

Es übersteigt den Rahmen dieser Arbeit, die komplexe Reaktionsweise von Makrophagen, T- und B-Lymphocyten und die Transformation von T- und B-Zellen in maligne Zellen darzustellen.

Entscheidend ist, daß zwischen Immunsystem, maligner Lymphocyten-Transformation und malignen Lymphomen eine enge Korrelation besteht. Diese komplexe Wechselwirkung könnte auch für andere menschliche Neoplasien ein wichtiger Faktor bei dem Wachstum und der Ausbreitung von Carcinomen sein.

5. Zusammenfassung

Autoradiographische Untersuchungen zur Zellkinetik der roten Pulpa, der weißen Pulpa und der Follikelrandzone werden in der Induktionsphase bei der Carcinogenese durch N-Nitroso-Morpholin durchgeführt. Drei verschiedene Konzentrationen des Carcinogens wurden angewandt. Je zwei Versuchstiere einer Gruppe wurden in kurzen zeitlichen Abständen untersucht:

bei der Tränkung mit einer 6 mg%igen NNM-Lösung wurden die Tiere nach 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 Tagen,

bei der Tränkung mit einer 12 mg%igen NNM-Lösung nach 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51 Tagen

und bei der Tränkung mit einer 50 mg%igen NNM-Lösung nach 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 Tagen getötet.

Die Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1) Unter N-Nitroso-Morpholin kommt es in der Milz zu keiner Steigerung der Zellneubildung. Besonders im Follikel-(Keim)-zentrum, wo die Markierungsindices um das 2 - 3-fache unter den Kontrollwerten liegen, ist die Hemmung der Zellneubildung unter NNM auffallend. Die bei allen Konzentrationen, wenn auch zu verschiedenen Zeitpunkten, auftretenden Markierungsmaxima sind eher durch eingewanderte markierte Zellen zu erklären, da ein reparatives Wachstum, reagierend auf einen toxischen Zellverlust, in der Milz nicht feststellbar ist.

2) Die starken Schwankungen der Markierungsindices der Kontrolltiere bis zum 30. Tag sind entweder durch unvermeidliche biologische Differenzen bei der ^{3}H-Thymidininjektion von Tier zu Tier, durch die Reutilisation radioaktiv markierter DNS-Bausteine von zerfallenen Zellen oder durch latent ablaufende Infektionen während der Tierhaltung bedingt.

3) Der Anstieg der Markierungsindices bei der 12 mg%igen und 50 mg%igen NNM-Konzentration in der roten Pulpa bis zum Maximum gegen Versuchsende ist wahrscheinlich durch eingewanderte Makrophagen entstanden.
Die Markierungsindices der 6 mg%igen NNM-Konzentration liegen gegen Versuchsende um die Hälfte unter den Kontrollwerten, was durch eine Hemmung der Makrophagen verursacht sein könnte.

4) In der Follikelrandzone als Übergangszone zwischen weisser und roter Pulpa findet ein erheblicher Durchfluß von Zellen statt. Die beiden Maxima der 6 mg%igen und 50 mg%igen Gruppen sind möglicherweise durch die Einwanderung markierter Lymphocyten aus der Follikelschale entstanden. Insgesamt ist eine Hemmung der Proliferation feststellbar.

5) Im Follikel-(Keim)-zentrum der weißen Pulpa kommt es bei der 6 mg%igen und 12 mg%igen NNM-Konzentration zu einer starken Hemmung der Proliferation, die als immunsuppressive Wirkung des NNM erklärt werden muß. Für die Follikelschale ist die Proliferationshemmung nicht so drastisch, aber deutlich.

6) Unter NNM ergeben sich in allen Milzzonen auffällige Schwankungen der Markierungsindices, die durch die toxische Wirkung des NNM auf den circadianen Rhythmus entstehen können. Eine Störung der komplexen Wechselwirkung zwischen Makrophagen, T- und B-Lymphocyten führt wahrscheinlich zu weiteren Schwankungen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

ALTMANN, H.-W.: Der Zellersatz, insbesondere an parenchymatösen Organen.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50,
15 - 53 (1966)

ALTMANN, H.-W. und O. KLINGE: Leber
in: Lehrbuch der speziellen Pathologie von F. BÜCHNER, 5. Auflage
Hrsg.: E. GRUNDMANN
Urban u. Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1974, Bd. 1, pp. 271 - 381

ASCHOFF, L.: Das reticulo-endotheliale System
Ergebn. Jun. Med. Kinderheilk.
26, 1 - 118 (1924)

BANNASCH, P.: The cytoplasm of hepatocytes during carcinogenesis.
Rec. Res. Cancer, Res. Vol. 19,
Berlin-Heidelberg-New York
Springer-Verlag, 1968
Carcinogen-induced cellular thesaurismoses and neoplastic cell transformation.
Rec. Res. Cancer Res. 1973

BANNASCH, P.: Präneoplastische Stadien der chemischen Carcinogenese: zelluläre Vorgänge.
Verh. Dtsch. Path. 63, 40 - 61 (1979)

BANNASCH, P. und O. KLINGE: Hepatocelluläre Glykogenose und Hepatombildung beim Menschen
Virchows Arch. Abt. A, Path. Anat., 352, 157 - 164 (1971)

BANNASCH, P. und H.-A. MÜLLER: Lichtmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von N-Nitroso-Morpholin auf die Leber von Ratte und Maus.
Arzneimittelforschung 14, 805 - 814, (1964)

BIZZOZERO, G.: Accrescimento e rigenerazione nell' organismo.
Arch. Sci. Med. 18 (1893)

BOUWENS, L. und E. WISSE: On the origin of Kupffer cell.
in: Kupffer cell bulletin for the scientific communication in the field of liver sinusoidal cells
eds.: WISSE, E., KNOOK, D.L. and KIRN A.
Volume 3, number 2
November, 1980, pp. 23 - 31

BRAHIM, F. und D. G. OSMOND: Migration of bone marrow lymphocytes demonstrated by selective bone marrow labeling with thymidin H^3.
Anat. Rec. 168, 139 - 160 (1970)

BRAUN, A.: Zur Zellproliferation der Rattenleber während der Applikation von unterschiedlichen Konzentrationen von N-Nitroso-Morpholin.
Med. Diss. Würzburg 1976

BURKE, J.S., und G. T. SIMON: Electron microscopy of the spleen II. Phagocytosis of colloidal carbon. Amer. J. Path. 58, 157 (1970)

COTTIER, H., M. W. HESS, J. SCHÄDELI und H. BÜRKI: Lymphocytenformen: Herkunft und Entwicklungsmöglichkeiten. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 79, 99 (1973)

COTTIER, H., M. W. HESS, H. U. KELLER und Th. SCHAFFNER: Chemokinese, Chemotaxis und Funktion von Phagocyten, mit besonderer Berücksichtigung der Makrophagen. Verh. Dtsch. Ges. Path. 64, 24 - 47 (1980)

CRADDOCK, C.G., R. LONGMIRE and R. McMILLAN: Lymphocytes and the immune response. First of two parts. New. Engl. J. Med. 285, 324 - 331 (1971 a)

CRADDOCK, C. G., R. LONGMIRE and R. McMILLAN: Lymphocytes and the immune response. Second of two parts. New. Engl. J. Med. 285, 378 - 384 (1971 b)

DRUCKREY, H.: Quantitative aspects in chemical carcinogenesis. in: Potential Carcinogenic Hazards from drugs. UICC Monograph Series 7, 59 - 77 (1967)

DRUCKREY, H. und K. KÜPFMÜLLER: Dosis und Wirkung. Ed. Cantor, Aulendorf (Württbg.) (1949)

DRUCKREY, H., R. PREUSSMANN, S. IVANKOVIC, und D. SCHMÄL: Organotrope carcinogenese Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten. Z. Krebsforsch. 69: 103 - 201 (1967)

ECKERT, G.: Umfang, zeitlicher Ablauf und Modus der Proliferation lienaler Zellen eben ausgewachsener und seniler Mäuse nach Applikation von Bordetella pertussis. Med. Diss. Würzburg (1976)

FISCHER, R.: Allgemeine Immunologie und Immunpathologie.
in: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie.
Hrsg.: M. EDER und P. GEDIGK
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1975, pp. 175 - 202

FISCHER, H.: Macrophages.
in: The immune system.
eds.: F. MELCHERS and K. RAJEWSKY
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1976, pp. 173 - 177

FLIEDNER, T. M., M. KESSE, E. F. CRONKITE u. J. S. ROBERTSON: Cell Proliferation in Germinal Centers of the rat spleen. Ann. NY. Acad. Sci. 113, 578 - 594 (1964)

VAN FURTH, R.: The mononuclear phagocyte system. Verh. Dtsch. Ges. Path. 64, 1 - 11 (1980)

VAN FURTH, R., Z. A. COHN, J. G. HIRSCH, J. H. HUMPHREY, W. G. SPECTOR, H. L. LANGEVOORT: The mononuclear phagocyte system: A new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. Bull. Wld. Hlth. Org. 46, 845 - 852 (1972)

GERSHON, R. K. und C. M. METZLER: Regulation of the immune response. in: The Immunopathology of lympho-reticular Neoplasms. eds.: TWOMEY, J. J. and GOOD, R. A. Plenum Medical Books New York/London 1978, pp. 23 - 51

GRAMLICH, F., J. FISCHER, K. DULLIEN, und P. LASCHTOWITZ: Die Milz bei Lebererkrankungen. in: Die Milz. Hrsg.: LENNERT, K. und HARMS, D. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1970, pp. 336 - 346

HAGEN, St.: Zur Zellproliferation der Rattenniere unter N-Nitroso-Morpholin in verschiedenen Konzentrationen. Med. Diss. Würzburg 1976

HEINE, H.-D.: Die Zellproliferation der Nierentubuli nach einseitiger Nephrektomie und ihre Beeinflußung durch circadiane Rhythmen. Med. Diss. Würzburg (1971)

HEINE, W.-D.: Das kompensatorische Nierenwachstum und seine Regulation. Med. Habil.-Schrift Würzburg 1973

HEINE, W.-D.: Proliferation Kinetics of Kupffer cells. in: The RES and pathogenesis of liver disease
eds.: H. LIEHR and M. GRÜN
Elsevier/North-Holland Biomedical press, Amsterdam 1980, pp. 27 - 44

HEINE, W.-D.: Ursprung und Zellkinetik sessiler Makrophagen am Beispiel der von Kupfferschen Sternzellen der Leber.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 64,
12 - 20 (1980)

HEINE, W.-D., E. STÖCKER und H.-D. HEINE: Tageszeitliche Rhythmen der Zellproliferation der Niere.
Naturwissenschaften 57,
94 - 95 (1970)

HEINE, W.-D., E. STÖCKER und H.-D. HEINE: Tageszeitliche Rhythmen der Zellproliferation in der kompensatorisch regenerierenden Niere nach unilateraler Nephrektomie.
Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 9,
75 - 96 (1971)

HEINE, W.-D. und E. STÖCKER: Zur Zellproliferation bei der kompensatorischen Hypertrophie nach 2/3 Nephrektomie.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 55,
659 - 664 (1971)

HEINE, W.-D., K. O. HADITSCH (a. G.), A. BRAUN (a.G.) u. R. MORATH: Zum Wachstum N-Nitroso-Morpholin induzierter präneoplastischer Herde in der Rattenleber. Verh. Dtsch. Path. 63, 520 (1979)

HELPAP, B. und U. DACHSELT: The pattern of lymphocytes in the thymus and spleen after labeling with ^{3}H thymidine and ^{3}H deoxycytidine. Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 28, 287 - 299 (1978)

HELPAP, B., V. GROULS und K. YAMASHITA: Histological and autoradiographical findings in the immunologically stimulated spleen. Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 19, 269 - 279 (1975)

HELPAP, B., K. YAMASHITA, V. GROULS und R. KASPRZYK: Zur cellulären Reaktion der Mäusemilz nach traumatischer Schädigung der Leber. Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 15, 237 - 250 (1974)

KRÜGER, G.R.F.: Morphologische und immunologische Klassifikation experimentell erzeugter maligner Lymphome. in: Lymphknotentumoren Hrsg.: STACHER, A. und HÖCKER, P. Urban & Schwarzenberg München-Wien-Baltimore 1979, pp. 55 - 59

LENNERT, K.: Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Springer Verl. Berlin-Heidelbg.-New York 1978

LENNERT, K.: Blut und blutbildende Organe.
in: Lehrbuch der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie.
Hrsg.: EDER, M. und GEDIGK, P.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1975, pp. 335 - 402

LUKES, R. J.: The immunologic approach to the pathology of malignant lymphomas.
Am. J. Clin. Pathol. 72,
657 - 669 (1979)

MAGEE, P.N. and J. M. BARNES: The production of malignant tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine
Br. J. Cancer 10, 114 - 122 (1956)

MALANGRÊ, J.: Zur kompensatorischen und reparativen Nierenregeneration nach 2/3 Nephrektomie.
Med. Diss. Würzburg (1971)

MAURER, W.: Grundlagen der Technik mit radioaktiven Isotopen.
in: Handbuch der Neurochirurgie
Hrsg.: OLIVECRONA, H. und TÖNNIS, W.
Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959, Bd. I/1, pp. 547 - 658

MELLBYE, O.J.: Spleen and immunity.
in: Die Milz.
eds.: LENNERT, K. und HARMS, D.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1970, pp. 139 - 144

MIESCHER, P. A., A. GEREBTZOFF und P. H. LAMBERT: Immunsuppressive Therapie. in: Lymphozyt und klinische Immunologie Hrsg.: THEML, H. und BEGEMANN, H. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1975, pp. 148 - 164

MITCHELL, J.: Antigens in Immunity. XVII. Migration of antigen-binding, bone-marrow derived and thymus-derived spleen cells in mice. Immunology 22, 231 - 245 (1972)

MITCHELL, J.: Lymphocyte circulation in the spleen. Marginal zone bridging channels and their possible role in cell trafic. Immunology 24, 93 - 107 (1973)

MÖLLER, G.: Characteristics of B-lymphocytes and their mechanism of activation. in: The immun system. eds.: MELCHERS, F. and RAJEWSKY, K. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1976, pp. 116 - 130

MÜLLER-HERMELINK, H.-K. und K. LENNERT: The cytologic, histologic and functional bases for a modern classification of lymphomas. in: LENNERT, K. Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1978, pp. 1 - 51

NEUMANN, H.-G.: Entstehung und Behandlung von Tumoren. in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie
Hrsg.: FORTH, W., HENSCHLER, D. und RUMMEL, W.
B. I. Wissenschaftsverlag
Mannheim-Wien-Zürich 1975, pp. 511 - 524

NOLTENIUS, H.: Die Funktion der Milz im Rahmen des RES. in: Die Milz
Hrsg.: LENNERT, K. und HARMS, D.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1970, pp. 145 - 161

PARKER, J. W.: Immunologic basis for the redefinition of malignant lymphomas.
Am. J. Clin. Pathol. 72,
670 - 686 (1979)

PARROT, D.M.V. u. M. de SOUSA: Thymus-dependent and thymus-independent populations: Origin, migratory patterns and lifespan.
Clin. exp. Immunol. 8,
663 - 684 (1971)

PEGG, A. E.: Dimethylnitrosamine inhibits enzymatic removal of O^6-methylguanine from DNA.
Nature (London) 274, 183 - 184 (1978)

PELC, S. R.: Autoradiograph technique.
Nature (London) 160,
749 - 750 (1947)

PILGRIM, Ch., W. ERB, und W. MAURER: Diurnal fluctuations in the numbers of DNA synthesizing nuclei in various mouse tissues. Nature (London) 199, 863 - 864 (1963)

PILGRIM, Ch., K.-J. LENNARTZ, K. WEGENER, S. HOLLWEG und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchung über tageszeitliche Schwankungen des ^{3}H-Thymidin-Index und des Mitose-Index bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Rattenfetus sowie bei Ascites-Tumorzellen. Z. Zellforschung 68, 138 - 154 (1965)

PILGRIM, Ch., W. LANG und W. MAURER: Autoradiographische Untersuchung der Dauer der S-Phase und des Generationszyklus der Basalepithelien des Ohres der Maus. Exp. Cell Res. 44, 129 - 138 (1966)

PREUSSMANN, R.: Analytik und Entstehung von N-Nitroso-Verbindungen. Arbeitsgruppe "Nitrat, Nitrit, Nitrosamine" der Senatskommission zur Prüfung fremder Stoffe bei Lebensmitteln. DFG-Mitteilungen 2/74, pp. 21 - 22 (1974)

SCHERF, H. R.: Untersuchungen an männlichen Sprague-Dawley-Ratten über Zusammenhänge zwischen der immunsuppressiven und der carcinogenen Wirkung bei vier N-Nitroso-Verbindungen. Z. Krebsforsch. 77, 189 - 193 (1972)

SCHMÄL, D.: Mögliche Wechselwirkung zwischen Tumor und Organismus. Bayerisches Ärzteblatt 9, 760 - 764 (1972)

SCHMÄL, D.: Zur kausalen Genese maligner Geschwülste. Arch. klin. exp. Ohr.-Nas. und Kehlk. Heilk. 205, 1 - 20 (1973)

SCHMÄL, D. und M. HABS: Carcinogenicity of N-nitroso compounds. Z. Oncology 37, 237 - 242 (1980)

SCHULTZE, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. in: Handbuch der Allg. Path. II/5, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1968, pp. 466 - 670

SHIGEYOSHI, O.: Overview: N-nitroso compounds as carcinogens for experimental animals and man. Z. Oncology 37, 282 - 286 (1980)

STÖCKER, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. Verh. Dtsch. Path. 50, 53 - 74 (1966)

STÖCKER, E. und H. FINGER: Autoradiographic studies on cell proliferation during splenomegaly induced by Bordetella pertussis in mice. Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 10, 179 - 183 (1972)

STUTTE, H. J.: Zur Pathogenese des Hypersplenismus. Dtsch. med. Wschr. 98, 388 - 394 (1973)

WIGZELL, H.: T-Lymphocytes. in: The immune system. eds.: MELCHERS, F. and RAJEWSKY, K. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1976, pp. 131 - 140

WREDE, E.: Proliferationsvorgänge in der Mäusemilz nach Applikation von Cyclophosphamid. Med. Diss. Würzburg (1975)

YAMASHITA, K. und B. HELPAP: Zur Zellzusammensetzung der roten Milzpulpa von Mäusen. I. Autoradiographische Untersuchung mit ^{3}H-Thymidin an Semidünnschnitten. Virchows Arch. Abt. B, Zellpath. 16, 331 - 346 (1974)

ZIMMERMANN, A., G. BRUN DEL RE, H. BÜRKI, H.-U. KELLER, M. W. HESS und H. COTTIER: Lymphocytenformen - Morphologische und funktionelle Charakterisierungsmöglichkeiten, Herkunft und Entwicklung. in: Lymphozyt und klinische Immunologie Hrsg.: THEML, H. und BEGEMANN, H. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1975, pp. 2 - 26

Herrn Prof. Dr. med. W.-D. HEINE
möchte ich für die Überlassung des
Dissertationsthemas und für seine
freundliche Unterstützung bei der
Durchführung der Arbeit meinen be-
sonderen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. med. H.-W. ALTMANN
danke ich für die Übernahme des
Korreferates.

L E B E N S L A U F

1947	Am 6.9.1947 wurde ich als erstes Kind des Bundesbahnamtmanns Hubertus MEISTERERNST und seiner Ehefrau Erika MEISTERERNST in Köritz, Kreis Ruppin geboren.
1954 - 1959	besuchte ich die Steintor-Schule in Rostock.
1959	Flucht unserer Familie aus der DDR.
1959 - 1960	besuchte ich die Volksschule in Datteln in Westfalen.
1960 - 1961	ging ich ab Frühjahr 1960 auf das Gymnasium in Datteln.
1961 - 1965	Die dienstliche Versetzung meines Vaters machte einen Wechsel auf das Rats-Gymnasium in Rotenburg/Wümme bis 1965 erforderlich.
1965 - 1969	Wegen einer erneuten Versetzung meines Vaters nach Elmshorn besuchte ich dort das Gymnasium bis 1969.
1969	legte ich an der Bismarck-Schule in Elmshorn das Abitur ab.
1969	begann ich im WS das Studium der Philosophie und der Theologie an der Hochschule St. Georgen in Frankfurt.
1971	bestand ich im Oktober mein Philosophikum.
1971	wechselte ich den Studienort nach Würzburg und schrieb mich im Fachbereich Theologie ein.
1972	im WS wechselte ich den Fachbereich und schrieb mich im Fachbereich Medizin ein.
1975	absolvierte ich im August mein Physikum.
1976	legte ich den 1. Abschnitt der "Ärztlichen Prüfung" ab.
1979	bestand ich im März den 2. Abschnitt.

1980 absolvierte ich im April und Mai den 3. Abschnitt der "Ärztlichen Prüfung".

1980 - 1981 promovierte ich bei Prof. Dr. med. W.-D. Heine am Pathologischen Institut in Würzburg.